

Dezembro de 2021

Instruções de utilização do *artus*[®] CMV RG PCR Kit (manual)



24 (n.º de catálogo 4503263)



96 (n.º de catálogo 4503265)

Versão 1

Diagnóstico in vitro quantitativo

Para utilização com instrumentos Rotor-Gene[®] Q MDx

IVD

CE 0197

REF

4503263, 4503265



QIAGEN GmbH

QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R7 **MAT**

1126759PT

Conteúdo

Utilização prevista	5
Descrição e princípio	5
Informações sobre agentes patogénicos	6
Princípio do procedimento.....	6
Materiais fornecidos	7
Conteúdo do kit	7
Materiais necessários, mas não fornecidos	8
Reagentes.....	8
Consumíveis	8
Equipamento.....	8
Avisos e precauções	9
Informações de segurança.....	9
Precauções	9
Armazenamento e manuseamento de reagentes.....	10
Armazenamento e manuseamento de espécimes	10
Colheita de espécimes	10
Armazenamento de amostras.....	11
Transporte de amostras	11
Procedimento	12
Isolamento de ADN	12
Controlo interno	13
Protocolo: PCR e análise de dados	14

Interpretação de resultados.....	22
Quantificação.....	22
Resultados.....	23
Controlo de qualidade.....	26
Limitações.....	26
Características de desempenho.....	27
Sensibilidade analítica.....	27
Intervalo linear.....	29
Especificidade.....	30
Precisão.....	32
Substâncias interferentes.....	34
Robustez.....	36
Reprodutibilidade.....	36
Avaliação de diagnóstico.....	38
Referências.....	40
Guia de resolução de problemas.....	41
Símbolos.....	43
Informações de encomenda.....	44
Histórico de revisões do documento.....	47

Utilização prevista

O *artus* CMV RG PCR Kit é um teste de amplificação de ácidos nucleicos in vitro, para a quantificação de ADN do citomegalovírus (CMV) no plasma humano. Este kit de teste de diagnóstico utiliza a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) e está configurado para ser utilizado com os instrumentos Rotor-Gene Q.

O *artus* CMV RG PCR Kit destina-se a ser utilizado em conjunto com a apresentação clínica e outros marcadores de laboratório para a gestão da infeção por CMV nos pacientes em risco de doença por CMV.

Os resultados do *artus* CMV RG PCR Kit devem ser interpretados no contexto de todos os resultados clínicos e laboratoriais relevantes.

O *artus* CMV RG PCR Kit não se destina a ser utilizado como teste de rastreamento para a presença de CMV no sangue ou em produtos sanguíneos, nem como um teste diagnóstico para confirmar a presença de infeção por CMV.

Descrição e princípio

O *artus* CMV RG PCR Kit é um sistema pronto a utilizar para a deteção de ADN do CMV através da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) nos instrumentos Rotor-Gene Q MDx. O CMV RG Master contém reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região de 105 bp do principal gene precoce imediato (*Major Immediate Early Gene, MIE*) no genoma do CMV (o ensaio consegue detetar genótipos CMV gB1 – gB4) para a deteção direta deste amplicon específico no canal de fluorescência Cycling Green do Rotor-Gene Q MDx.

Além disso, o *artus* CMV RG PCR Kit contém um segundo sistema de amplificação heterólogo para identificar uma possível inibição da PCR. Isto é detetado como um controlo interno (CI) no canal de fluorescência Cycling Yellow do Rotor-Gene Q MDx. São fornecidos controlos positivos externos (CMV QS 1–4) que permitem a determinação da quantidade de ADN viral. Para mais informações, consulte "Quantificação", na página 22.

Informações sobre agentes patogénicos

O citomegalovírus humano (CMV) é encontrado no sangue, tecidos e praticamente todos os fluidos corporais de pessoas infetadas. A transmissão pode ocorrer por via oral, sexual, por transfusão sanguínea ou transplantação de órgãos, por via intrauterina ou perinatal (1-4). Os testes de carga viral do CMV são uma ferramenta importante para avaliar o risco de doença, diagnosticar a doença e monitorizar a resposta à terapia (5).


A infeção por CMV é frequentemente uma infeção assintomática, a que se segue um período de latência permanente do vírus no corpo. Caso a infeção seja sintomática, em adolescentes ou em adultos, os sintomas são semelhantes aos da mononucleose e incluem febre, hepatite ligeira e indisposição geral (6). Foram observadas evoluções graves da infeção por CMV, em particular nos doentes infetados por via intrauterina ou em doentes imunodeficientes (4,7).

Princípio do procedimento

A deteção de agentes patogénicos pela reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) baseia-se na amplificação de regiões específicas do genoma do agente patogénico. Na real-time PCR, o produto amplificado é detetado através de marcadores fluorescentes. Estes são geralmente ligados a sondas de oligonucleotídeos que se ligam especificamente ao produto amplificado. A monitorização das intensidades de fluorescência durante a execução de PCR (ou seja, em tempo real) permite a deteção e quantificação do produto que se acumula sem ter de reabrir os tubos de reação após a execução de PCR (8).

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

<i>artus CMV RG PCR Kit</i>			(24)	(96)
N.º de catálogo			4503263	4503265
Número de reações			24	96
Azul	CMV RG Master (Taq 0,1 U/µl)		2 x 12 reações	8 x 12 reações
Amarelo	CMV Mg-Sol*	Mg-Sol	600 µl	600 µl
Vermelho	CMV QS 1† (1 x 104 cópias/µl)	QS	200 µl	200 µl
Vermelho	CMV QS 2† (1 x 103 cópias/µl)	QS	200 µl	200 µl
Vermelho	CMV QS 3† (1 x 102 cópias/µl)	QS	200 µl	200 µl
Vermelho	CMV QS 4† (1 x 101 cópias/µl)	QS	200 µl	200 µl
Verde	CMV RG IC‡	IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Branco	Water (PCR grade) (Água [grau PCR])		1000 µl	1000 µl
	Instruções de utilização		1	1

* Solução de magnésio

† Padrão de quantificação

‡ Controlo interno

Materiais necessários, mas não fornecidos

Reagentes

- Kit de isolamento de ADN (consulte "Isolamento de ADN", na página 12)

Consumíveis

- Pontas de pipetas estéreis com filtros
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, para utilização com o 72-Well Rotor (n.º de cat. 981103 ou 981106)
- **Em alternativa:** PCR Tubes, 0.2 ml, para utilização com o 36-Well Rotor (n.º de cat. 981005 ou 981008)

Equipamento

- Pipetas (ajustáveis)*
- Misturador vórtex*
- Centrífuga de bancada* com rotor de tubos de reação de 2 ml
- Instrumentos Rotor-Gene Q MDx* com canais de fluorescência para Cycling Green e Cycling Yellow
- Software Rotor-Gene Q, versão 2.3.5 ou superior
- Bloco de refrigeração (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, n.º de cat. 9018901 ou Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, n.º de cat. 9018905)

* Antes de utilizar, certifique-se de que os instrumentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Avisos e precauções

Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet, SDS) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF prático e compacto em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS de cada kit QIAGEN e respetivos componentes.

Elimine os resíduos de amostra e ensaio de acordo com os regulamentos de segurança locais.

Precauções

O utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- Utilize pontas de pipetas estéreis com filtros.
- Armazene e extraia materiais positivos (espécimes, controlos positivos e amplicons) separadamente de todos os outros reagentes e adicione-os à mistura de reação numa instalação em separado.
- Descongele completamente todos os componentes à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de dar início a um ensaio.
- Quando estiverem descongelados, misture os componentes (pipetando repetidamente para cima e para baixo ou agitando em vórtex) e centrifugue com brevidade.
- Trabalhe com rapidez e mantenha os componentes em gelo ou no bloco de refrigeração (bloco de carregamento de 72/96 poços).

Armazenamento e manuseamento de reagentes

Os componentes do *artus* CMV RG PCR Kit devem ser armazenados entre -30 °C e -15 °C e são estáveis até ao prazo de validade indicado no rótulo. Deve evitar-se o congelamento e descongelamento repetidos (>2x), uma vez que tal pode reduzir a sensibilidade do ensaio. Se os reagentes se destinarem a uso intermitente, devem ser congelados em alíquotas. O armazenamento a 2–8 °C não deve exceder um período de 5 horas.

Armazenamento e manuseamento de espécimes

Nota: Todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente infeccioso.

Nota: Os estudos analíticos realizados para verificar o desempenho deste kit apontam o plasma EDTA como o material de amostra mais adequado para a deteção do CMV. Por conseguinte, recomenda-se a utilização deste material com o *artus* CMV RG PCR Kit.

A validação do *artus* CMV RG PCR Kit foi efetuada utilizando amostras de plasma EDTA humano. Não existem outros materiais de amostra validados. Utilize apenas o kit de isolamento de ácido nucleico recomendado (consulte "Isolamento de ADN", na página 12) para a preparação da amostra.

Ao utilizar determinados materiais de amostra, devem ser rigorosamente observadas as instruções específicas relativas à colheita, transporte e armazenamento.

Colheita de espécimes

Cada colheita de sangue induz lesões dos vasos sanguíneos (artérias, veias ou lesões capilares). Devem apenas ser utilizados materiais inócuos e estéreis. Para a colheita de sangue, deverão estar disponíveis materiais descartáveis adequados. Para punções venosas, não devem ser utilizadas agulhas capilares demasiado finas. A colheita de sangue venoso deve ser efetuada nas partes adequadas da flexura do cotovelo, no antebraço ou no dorso da mão. O sangue tem de ser colhido com tubos de colheita de espécimes padrão (tampa vermelha, Sarstedt® ou tubo equivalente de outro fabricante). Deve ser colhido um volume de 5–10 ml de sangue para um tubo EDTA. Inverter os tubos diretamente após a colheita da amostra para correta homogeneização (8x, sem agitar).

Nota: Não devem ser utilizadas amostras heparinizadas.

Armazenamento de amostras

O sangue total deve ser separado em plasma e componentes celulares por centrifugação durante 20 minutos a 800–1600 x g no prazo de 6 horas (9,10). O plasma isolado é transferido para tubos de polipropileno estéreis. A sensibilidade do ensaio pode ser reduzida se as amostras forem congeladas regularmente ou armazenadas durante um período de tempo superior.

Transporte de amostras

Regra geral, o material de amostra deve ser transportado num contentor de transporte à prova de estilhaço. Assim, o perigo potencial de infeção devido a fuga da amostra pode ser evitado. As amostras devem ser transportadas de acordo com as instruções locais e nacionais para o transporte de material patogénico.*

As amostras devem ser enviadas no prazo de 6 horas. Não se recomenda o armazenamento das amostras onde estas foram colhidas. É possível enviar as amostras por correio, seguindo as instruções legais para o transporte de material patogénico. Recomenda-se que o transporte de amostras seja efetuado por transportadores. As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas (2–8 °C) e o plasma separado deve ser enviado congelado (-30 a -15 °C).

* Associação Internacional de Transporte Aéreo (International Air Transport Association, IATA). Regulamentos para mercadorias perigosas.

Procedimento

Isolamento de ADN

Os kits da QIAGEN apresentados na Tabela 1 foram validados para a purificação de ADN dos tipos de amostras humanas indicados para utilização com o *artus* CMV RG PCR Kit. Efetue a purificação de ADN viral de acordo com as instruções presentes nos respetivos manuais dos kits.

Tabela 1. Kits de purificação validados para utilização com o *artus* CMV RG PCR Kit

Material de amostra	Tamanho da amostra	Kit de isolamento do ácido nucleico	Número de catálogo	ARN transportador
Plasma EDTA	500 µl	QIAamp® DSP Virus Kit	60704	Incluído
Plasma EDTA	400 µl	EZ1® DSP Virus Kit (48)	62724	Incluído

Nota: A utilização de ARN transportador é de grande importância para a eficiência da extração e, por conseguinte, para o rendimento do ADN/ARN. Para aumentar a estabilidade do ARN transportador fornecido com o QIAamp DSP Virus Kit, recomenda-se proceder de acordo com as informações sobre a reconstituição e armazenamento do ARN transportador fornecidas na secção "Preparação de reagentes e tampões" do *Manual do QIAamp DSP Virus Kit*.

Nota: O controlo interno do *artus* CMV RG PCR Kit pode ser utilizado diretamente no procedimento de isolamento. Certifique-se de que incluiu uma amostra de plasma negativo no procedimento de isolamento. O sinal correspondente do controlo interno é a base para a avaliação do isolamento (consulte a secção "Controlo interno" abaixo).

Controlo interno

É fornecido um controlo interno (CMV RG IC) com este kit. Isto permite ao utilizador controlar o procedimento de isolamento de ADN e verificar a existência de uma eventual inibição da PCR. Para este fim, adicione o controlo interno numa relação de 0,1 µl por 1 µl do volume de eluição no isolamento. Por exemplo, ao utilizar o QIAamp DSP Virus Kit, o ADN é eluído em 60 µl de tampão de eluição (AVE). Portanto, devem ser adicionados inicialmente 6 µl de controlo interno. A quantidade de controlo interno utilizado depende apenas do volume de eluição.

Nota: O controlo interno e o ARN transportador (consulte "Isolamento de ADN", na página 12) devem ser adicionados apenas à mistura de tampão de lise e material de amostra ou diretamente ao tampão de lise.

O controlo interno não deve ser adicionado diretamente ao material de amostra. Se adicionado ao tampão de lise, tenha em atenção que a mistura de controlo interno e tampão de lise com ARN transportador tem de ser preparada no momento e utilizada de imediato (o armazenamento da mistura à temperatura ambiente ou no frigorífico durante apenas algumas horas pode levar à falha do controlo interno e a uma eficiência reduzida da extração).

Nota: Não adicione o controlo interno e o ARN transportador diretamente ao material de amostra.

Para ser considerada uma purificação bem-sucedida, o valor C_T do controlo interno de uma amostra de plasma negativo processada durante a purificação (QIAamp DSP Virus Kit) tem de atingir $C_T = 27 \pm 3$ (limiar: 0,03) utilizando instrumentos Rotor-Gene Q (consulte a página 25 para obter mais informações). A propagação declarada tem por base a variância do instrumento e a purificação. A existência de um maior desvio aponta para um problema de purificação. Neste caso, a purificação tem de ser verificada e, se necessário, validada uma segunda vez. Em caso de dúvidas ou problemas, contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN.

Como opção, o controlo interno pode ser utilizado exclusivamente para verificar a existência de uma eventual inibição da PCR. Para esta aplicação, adicione o controlo interno diretamente ao CMV RG Master e CMV Mg-Sol, tal como descrito no passo 2b do protocolo (página 15).

Protocolo: PCR e análise de dados

Pontos importantes antes de começar

- É conveniente familiarizar-se com o instrumento Rotor-Gene Q antes de iniciar o protocolo. Consulte o respetivo manual do utilizador do instrumento para obter mais informações.
- Certifique-se de que, pelo menos, um padrão de quantificação e um controlo negativo (Água, grau PCR) são incluídos por execução de PCR. Para gerar uma curva-padrão, utilizar os 4 padrões de quantificação fornecidos (CMV QS 1–4) para cada execução de PCR.

Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- Certifique-se de que o bloco de refrigeração (acessório do instrumento Rotor-Gene Q) é pré-arrefecido a 2–8 °C.
- Antes de cada utilização, todos os reagentes têm de ser completamente descongelados, misturados (por pipetagem repetida para cima e para baixo ou por ação rápida do vórtex) e brevemente centrifugados.

Procedimento

1. Coloque o número desejado de tubos de PCR nos adaptadores do bloco de refrigeração.
2. Se estiver a utilizar o controlo interno para monitorizar o procedimento de isolamento de ADN e para verificar a existência de uma eventual inibição da PCR, siga o passo 2a. Se estiver a utilizar o controlo interno exclusivamente para verificar a existência de uma inibição da PCR, siga o passo 2b.

Nota: Recomenda-se vivamente a adição do controlo interno ao CMV RG Master e CMV Mg-Sol utilizados para os padrões de quantificação. Para os padrões de quantificação, adicione diretamente o controlo interno ao CMV RG Master e CMV Mg-Sol, conforme descrito no passo 2b do protocolo, e utilize esta mistura principal para cada padrão de quantificação (CMV QS 1–4).

2a. O controlo interno já foi adicionado ao isolamento (consulte *Controlo interno*, na página 13). Neste caso, prepare uma mistura principal de acordo com a Tabela 2 (na página seguinte).

Geralmente, a mistura de reação contém todos os componentes necessários para a PCR, exceto a amostra.

Tabela 2. Preparação da mistura principal (controlo interno utilizado para monitorizar o isolamento de ADN e verificar a inibição da PCR)

Número de amostras	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	0 µl	0 µl
Volume total	30 µl	360 µl

2b. O controlo interno deve ser adicionado diretamente à mistura de CMV RG Master e CMV Mg-Sol. Neste caso, prepare uma mistura principal de acordo com a Tabela 3. Geralmente, a mistura de reação contém todos os componentes necessários para a PCR, exceto a amostra.

Tabela 3. Preparação da mistura principal (controlo interno utilizado exclusivamente para verificar a inibição da PCR)

Número de amostras	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	2 µl	24 µl
Volume total	32 µl*	384 µl*

*O aumento de volume causado pela adição de controlo interno é negligenciado durante a preparação do ensaio de PCR. A sensibilidade do sistema de deteção não é comprometida.

3. Pipete 30 µl da mistura principal em cada tubo de PCR e, em seguida, adicione 20 µl de ADN da amostra eluída (consulte a Tabela 4). Da mesma forma, deverão ser utilizados 20 µl de, pelo menos, um dos padrões de quantificação (CMV QS 1–4) como um controlo positivo e 20 µl de água (Água, grau PCR) como um controlo negativo.

Tabela 4. Preparação do ensaio de PCR

Número de amostras	1	12
Mistura principal	30 µl	30 µl cada
Amostra	20 µl	20 µl cada
Volume total	50 µl	50 µl cada
Número de amostras	1	12

4. Feche os tubos de PCR. Certifique-se de que o anel de bloqueio (acessório do instrumento Rotor-Gene) é colocado na parte superior do rotor para evitar a abertura acidental dos tubos durante a execução.
5. Para a detecção de ADN do CMV, crie um perfil de temperatura de acordo com os passos a seguir indicados.

Definição dos parâmetros gerais do ensaio	Figura 1, Figura 2 e Figura 3
Ativação inicial da enzima de inicialização a quente	Figura 4
Amplificação do ADN (PCR touchdown)	Figura 5
Ajuste da sensibilidade do canal de fluorescência	Figura 6
Iniciar a execução	Figura 7

Todas as especificações são referentes à versão 2.3.5 do software do Rotor-Gene Q ou superior. Pode encontrar mais informações sobre a programação dos instrumentos Rotor-Gene no respetivo manual do utilizador do instrumento. Nas ilustrações, estas definições têm uma moldura a negrito. As ilustrações estão incluídas nos instrumentos Rotor-Gene Q.

6. Abra a caixa de diálogo **New Run Wizard** (Assistente de nova execução) (Figura 1, na página seguinte). Marque a caixa **Locking Ring Attached** (Anel de bloqueio anexado) e clique em **Next** (Seguinte).

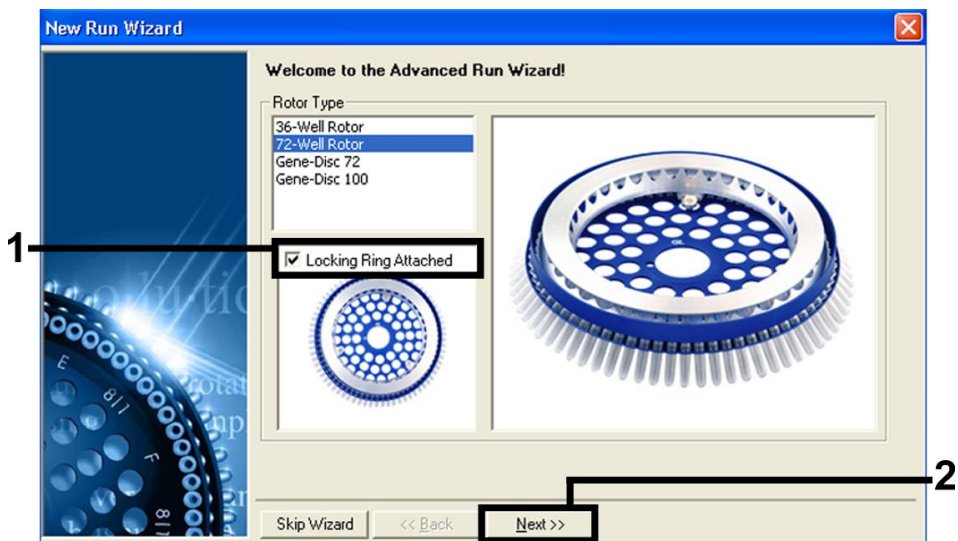


Figura 1. A caixa de diálogo "New Run Wizard" (Assistente de nova execução).

7. Selecione 50 para o volume de reação PCR e clique em **Next** (Seguinte) (Figura 2).

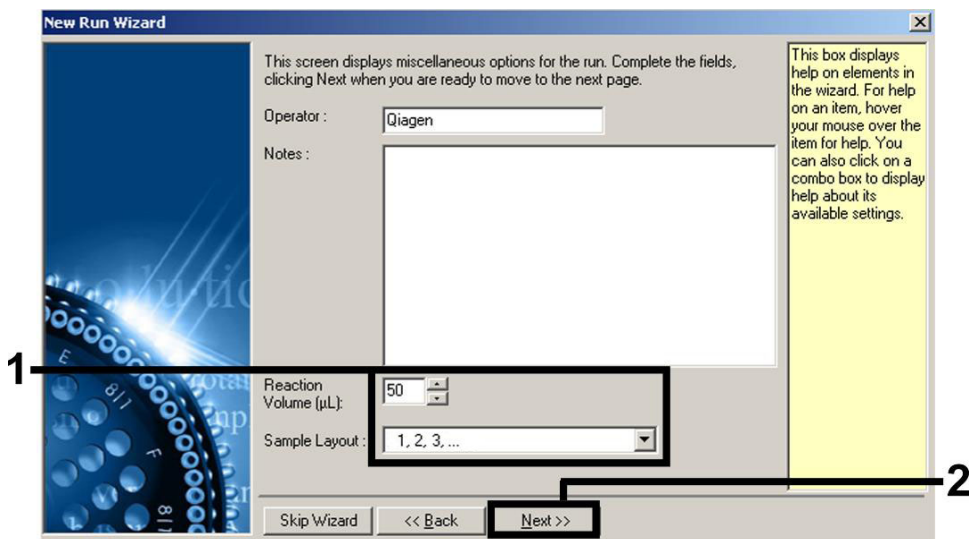


Figura 2. Definição dos parâmetros gerais do ensaio.

8. Clique no botão **Edit Profile** (Editar perfil) na caixa de diálogo seguinte do **New Run Wizard** (Assistente de nova execução) (Figura 3) e programe o perfil de temperatura conforme indicado nas Figuras 3 a 5.

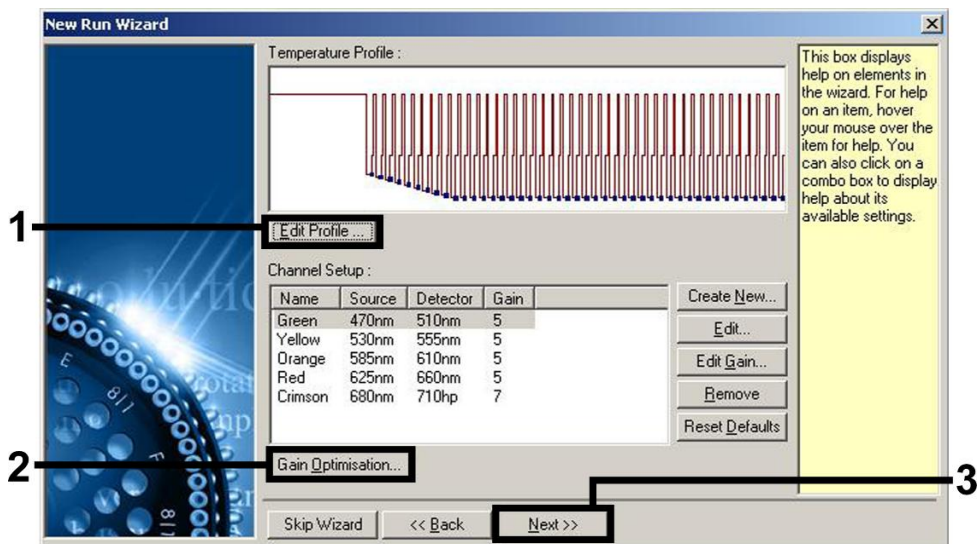


Figura 3. Edição do perfil.

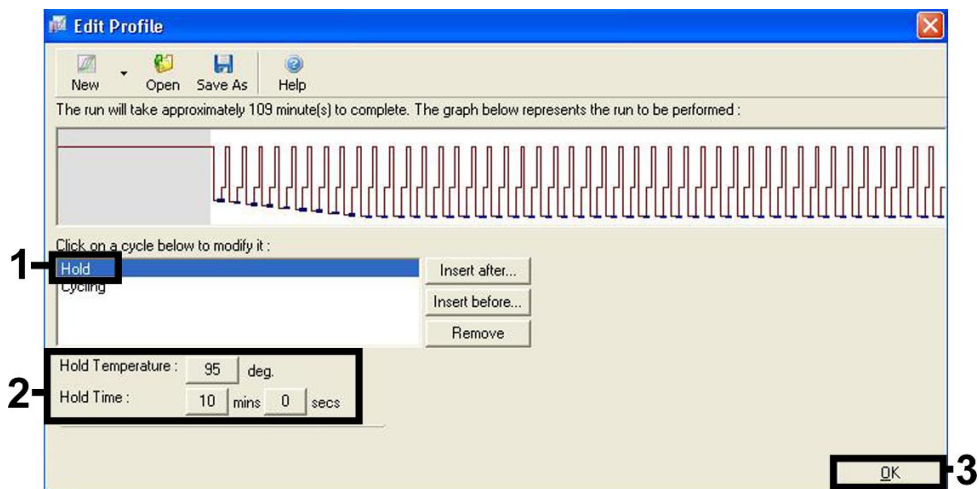


Figura 4. Ativação inicial da enzima de inicialização a quente.

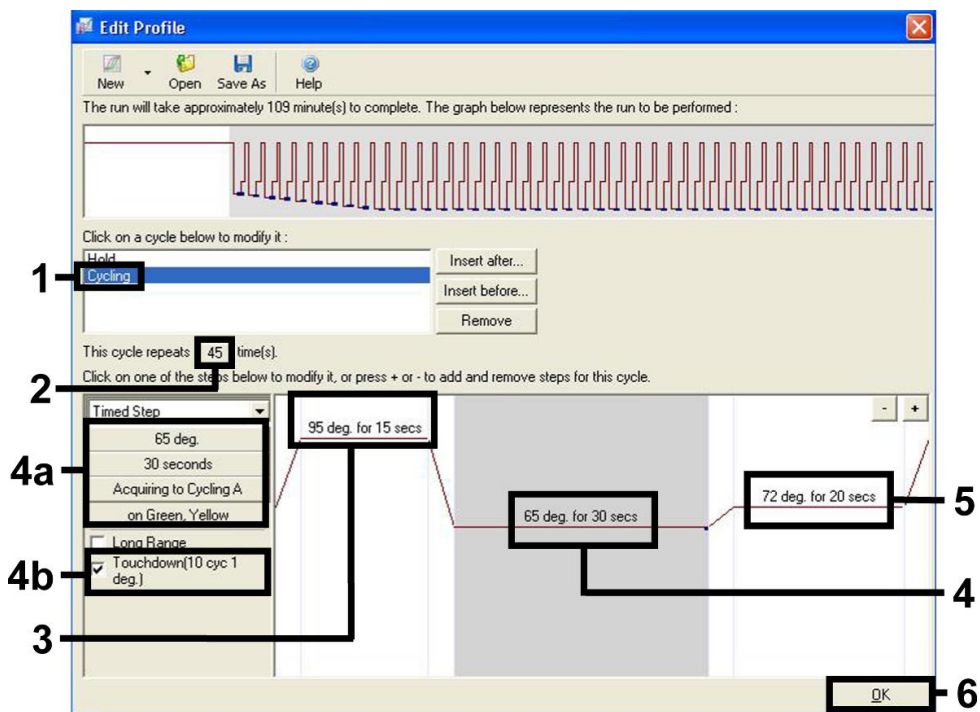


Figura 5. Amplificação do ADN. Ative sempre a função Touchdown para 10 ciclos no passo Annealing (Hibridização).

9. O intervalo de detecção dos canais de fluorescência tem de ser determinado de acordo com as intensidades de fluorescência nos tubos de PCR. Clique em **Gain Optimisation** (Otimização de ganho) na caixa de diálogo **New Run Wizard** (Assistente de nova execução) (consulte a Figura 3, na página anterior) para abrir a caixa de diálogo **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configuração da otimização de ganho automático). Defina a temperatura de calibração para 65 °C para igualar a temperatura de hibridização do programa de amplificação (Figura 6, na página seguinte).

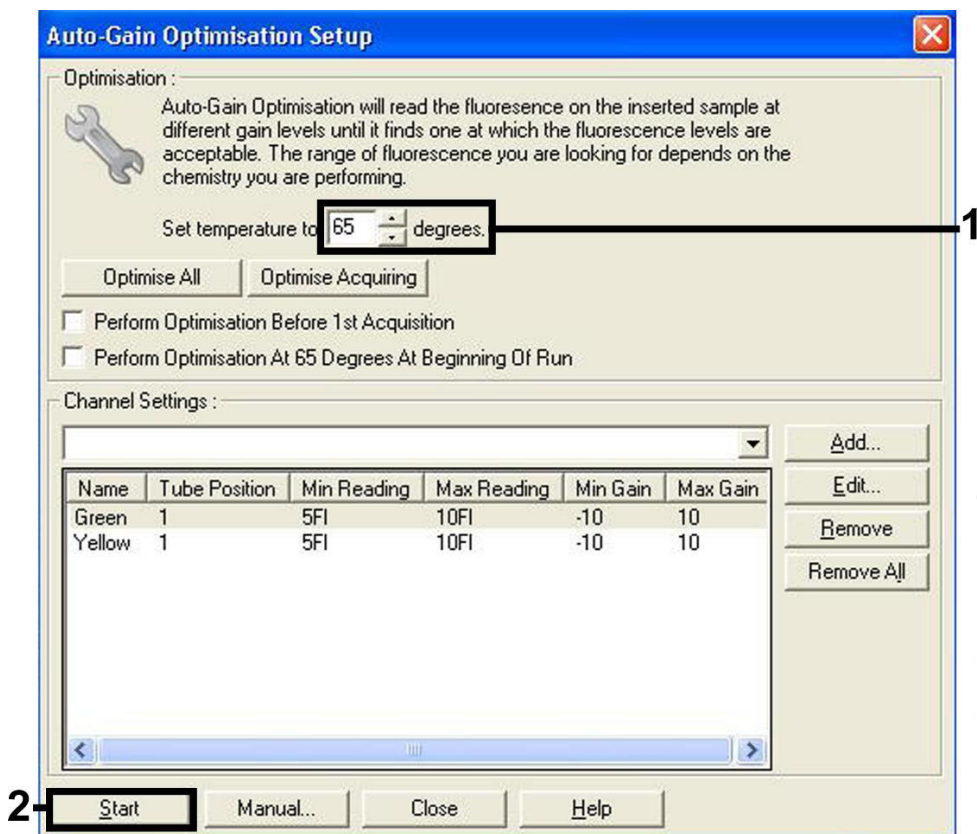


Figura 6. Ajuste da sensibilidade do canal de fluorescência.

- Os valores de ganho determinados pela calibração do canal são guardados automaticamente e são enumerados na última janela do menu do procedimento de programação (Figura 7, na página seguinte). Clique em **Start Run** (Iniciar execução).

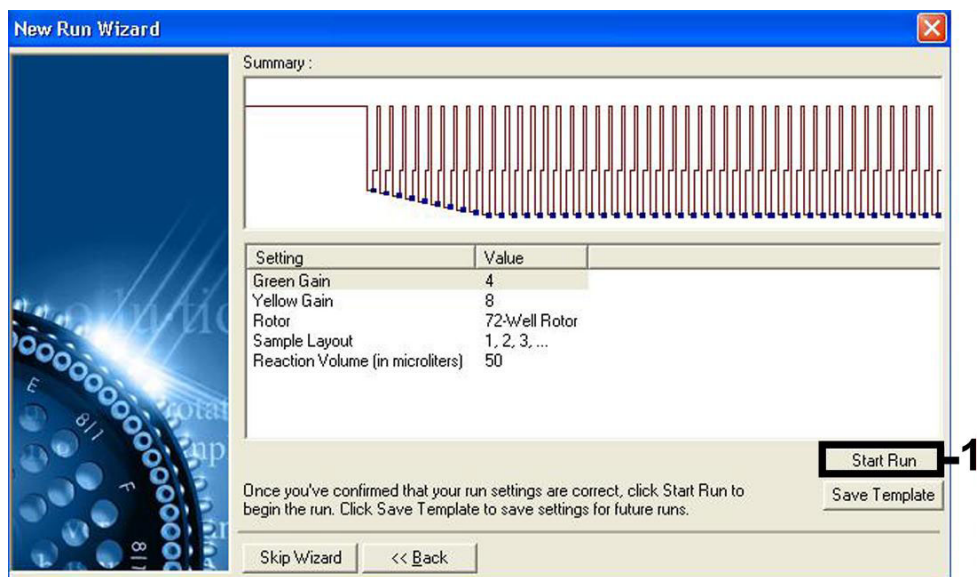


Figura 7. Iniciar a execução.

Interpretação de resultados

Quantificação

Os padrões de quantificação fornecidos (CMV QS 1–4) são tratados como amostras previamente purificadas e o mesmo volume de 20 µl é utilizado diretamente na PCR (sem necessidade de extração adicional). Para gerar uma curva-padrão nos instrumentos Rotor-Gene Q, os 4 padrões de quantificação devem ser utilizados e definidos na caixa de diálogo **Edit Samples** (Editar amostras) como padrões com as concentrações especificadas (consulte o respetivo manual de utilizador do instrumento).

Nota: Para assegurar a quantificação precisa, recomenda-se vivamente a adição do controlo interno ao CMV RG Master e CMV Mg-Sol utilizados para os padrões de quantificação. Para esta aplicação, adicione diretamente o controlo interno ao CMV RG Master e CMV Mg-Sol, conforme descrito no passo 2b do protocolo (página 15) e utilize esta mistura principal para cada padrão de quantificação (CMV QS 1–4).

Nota: Os padrões de quantificação são definidos como cópias/µl. A seguinte equação tem de ser aplicada para converter os valores determinados utilizando a curva-padrão para cópias/ml de material de amostra:

$$\text{Resultado} \left(\frac{\text{cópias}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Resultado (cópias/}\mu\text{l)} \times \text{Volume de eluição (}\mu\text{l)}}{\text{Volume de amostra (ml)}}$$

Como regra geral, o volume de amostra inicial deve ser introduzido na equação acima. Isto tem de ser considerado quando o volume da amostra tiver sido alterado antes da extração do ácido nucleico (por ex., reduzindo o volume por centrifugação ou aumentando o volume adicionando ao volume necessário para o isolamento).

Nota: Os padrões de quantificação foram calibrados em relação à Primeira Padronização Internacional da OMS (Organização Mundial da Saúde) para o Citomegalovírus Humano (código 09/162 do NIBSC).

Para converter cópias/ml em UI/ml, tendo em consideração o QIAamp DSP Virus Kit:

$$\text{OMS (UI/ml)} = 2,933 \times \text{artus CMV (cópias/ml)}$$

Nota: Para o fluxo de trabalho do QIAamp, as amostras quantificadas devem estar dentro do intervalo linear QS 1×10^1 para 1×10^4 cópias/ μ l. Não é possível assegurar a quantificação fora deste intervalo.

Para converter cópias/ml em UI/ml, tendo em consideração o EZ1 DSP Virus Kit no instrumento EZ1 Advanced XL:

$$\text{OMS (UI/ml)} = 0,794 \times \text{artus CMV (cópias/ml)}$$

Nota: Para o fluxo de trabalho do EZ1, as amostras quantificadas devem estar dentro do intervalo linear $3,16E+02$ a $1,00E+08$ cópias/ml. Não é possível assegurar a quantificação fora deste intervalo.

Resultados

A Figura 8 e a Figura 9 (na página seguinte) apresentam exemplos de reações de PCR positivas e negativas.

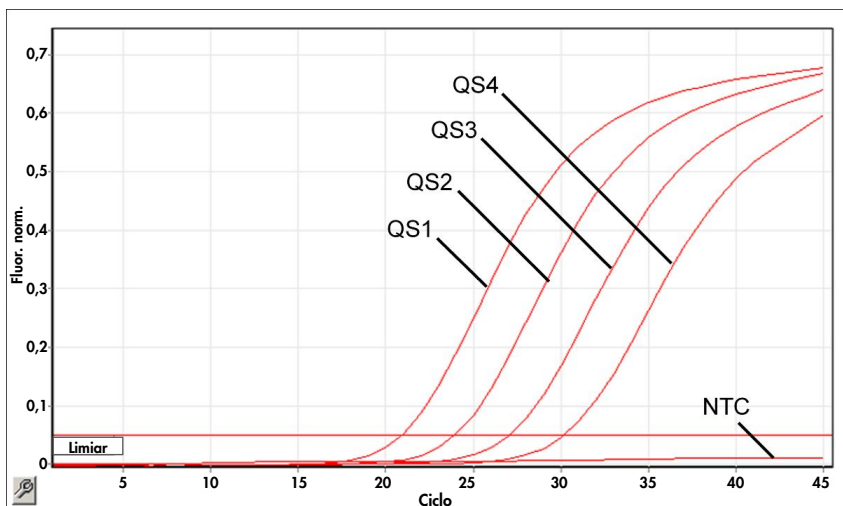


Figura 8. Detecção dos padrões de quantificação (CMV QS 1-4) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: Controle sem modelo (controle negativo).

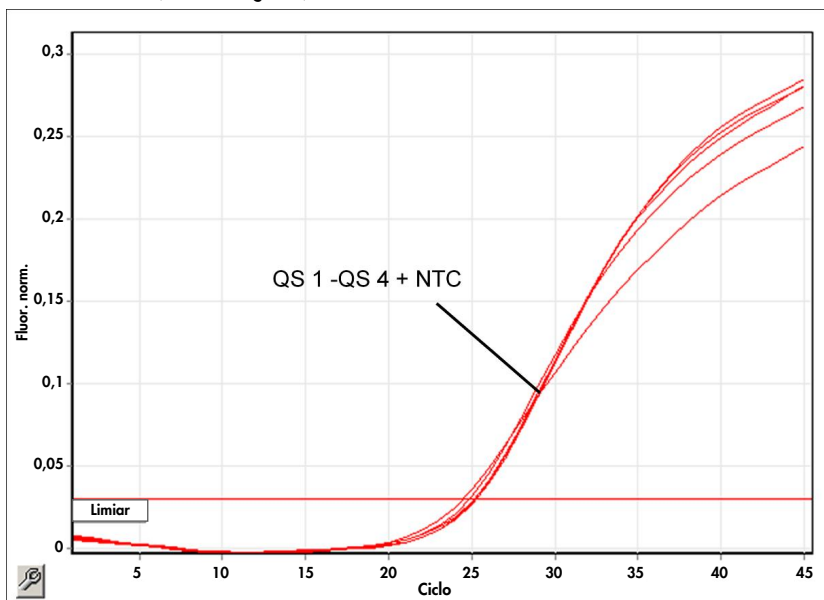


Figura 9. Detecção do controle interno (CI) no canal de fluorescência Cycling Yellow com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (CMV QS 1-4). NTC: Controle sem modelo (controle negativo).

É detetado um sinal no canal de fluorescência Cycling Green.

O resultado da análise é positivo: a amostra contém ADN do CMV.

Neste caso, a deteção de um sinal no canal Cycling Yellow é dispensável, uma vez que as concentrações iniciais elevadas de ADN do CMV (sinal positivo no canal Cycling Green) podem levar a um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do controlo interno no canal Cycling Yellow (competição).

Não é detetado sinal no canal de fluorescência Cycling Green. Ao mesmo tempo, aparece um sinal do controlo interno no canal Cycling Yellow.

Não é detetável qualquer ADN do CMV na amostra. Pode ser considerado negativo.

No caso de uma PCR negativa para CMV, o sinal detetado do controlo interno exclui a possibilidade de inibição da PCR.

Não é detetado sinal nos canais Cycling Green ou Cycling Yellow.

Não pode inferir-se qualquer resultado.

As informações relativas às fontes de erros e às respetivas soluções podem ser encontradas em "Guia de resolução de problemas", na página 41.

Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de gestão da qualidade da QIAGEN certificado pela norma ISO, todos os lotes do *artus* CMV RG PCR Kit são testados face a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade consistente do produto.

Limitações

Todos os reagentes são apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.

O produto deve ser utilizado por pessoal com formação específica em procedimentos de diagnóstico *in vitro* e devidamente instruído para o efeito.

Para resultados de PCR ótimos, é necessário que o respetivo manual do utilizador do instrumento seja rigorosamente observado.

Deverá ser dada atenção aos prazos de validade impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não utilize componentes fora do prazo de validade.

Embora raras, as mutações nas regiões altamente conservadas do genoma viral cobertas pelos primers e/ou sonda do kit podem resultar em subquantificação ou falha em detetar a presença do vírus nestes casos. A validade e o desempenho do ensaio são revistos regularmente.

Características de desempenho

Sensibilidade analítica

O limite de detecção analítica, bem como o limite de detecção analítica relativa à purificação (limites de sensibilidade) foram avaliados relativamente ao *artus* CMV RG PCR Kit. O limite de detecção analítica relativa à purificação é determinado utilizando espécimes clínicos positivos para CMV em conjunto com um método de extração específico. Por outro lado, o limite de detecção analítica é determinado independentemente do método de extração selecionado, utilizando ADN do CMV de concentração conhecida.

Para determinar a sensibilidade analítica do *artus* CMV RG PCR Kit foi criada uma série de diluições de ADN genómico do CMV de 10 até ao valor nominal de 0,00316 cópias/ μ l e analisada em instrumentos Rotor-Gene em conjunto com o *artus* CMV RG PCR Kit. Os testes foram efetuados em 3 dias diferentes em 8 réplicas. Os resultados foram determinados por análise de probit. Uma ilustração gráfica da análise de probit do Rotor-Gene 6000 é apresentada na Figura 10 (na página seguinte). O limite de detecção analítica do *artus* CMV RG PCR Kit em conjunto com o Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 e o Rotor-Gene 3000 é de 0,36 cópias/ μ l ($p = 0,05$) e 0,24 cópias/ μ l ($p = 0,05$), respetivamente. Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de as 0,36 cópias/ μ l ou as 0,24 cópias/ μ l serem detetadas.

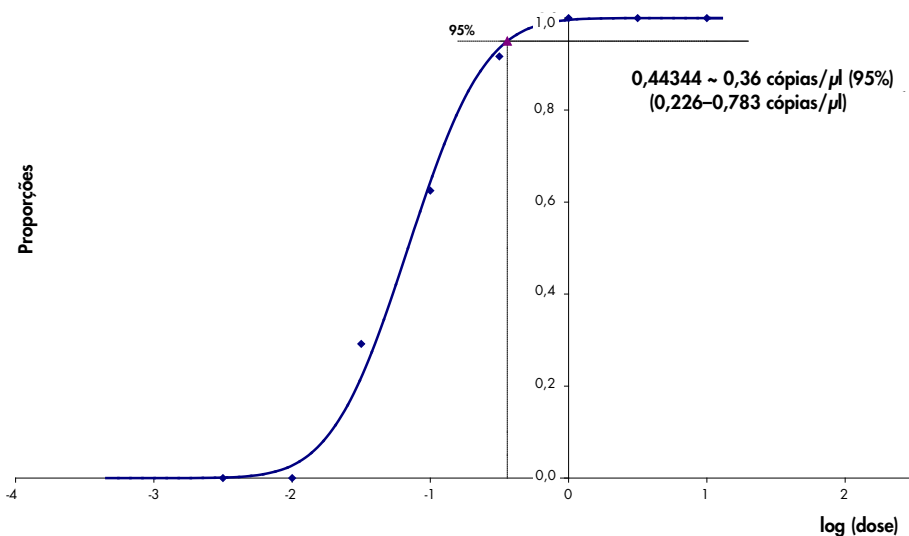


Figura 10. Análise de probit: CMV (Rotor-Gene 6000). Sensibilidade analítica do *artus* CMV RG PCR Kit no Rotor-Gene 6000.

A sensibilidade analítica relativa à purificação (QIAamp DSP Virus Kit) do *artus* CMV RG PCR Kit nos instrumentos Rotor-Gene foi determinada utilizando espécimes de plasma clínicos enriquecidos com uma série de diluições de material do vírus CMV de 1000 ao valor nominal de 0,316 cópias de CMV/ml. Foram submetidos a extração de ADN utilizando o QIAamp DSP Virus Kit (volume de extração: 0,5 ml, volume de eluição: 60 μl). Cada uma das 8 diluições foi analisada com o *artus* CMV RG PCR Kit em 3 dias diferentes em 8 réplicas. Os resultados foram determinados por análise de probit. Uma ilustração gráfica da análise de probit é apresentada na Figura 11 (na página seguinte). O limite de detecção analítica relativa à purificação do *artus* CMV RG PCR Kit em conjunto com o Rotor-Gene 3000 é de 57,1 cópias/ml ($p = 0,05$). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite de 57,1 cópias/ml ser detetado.

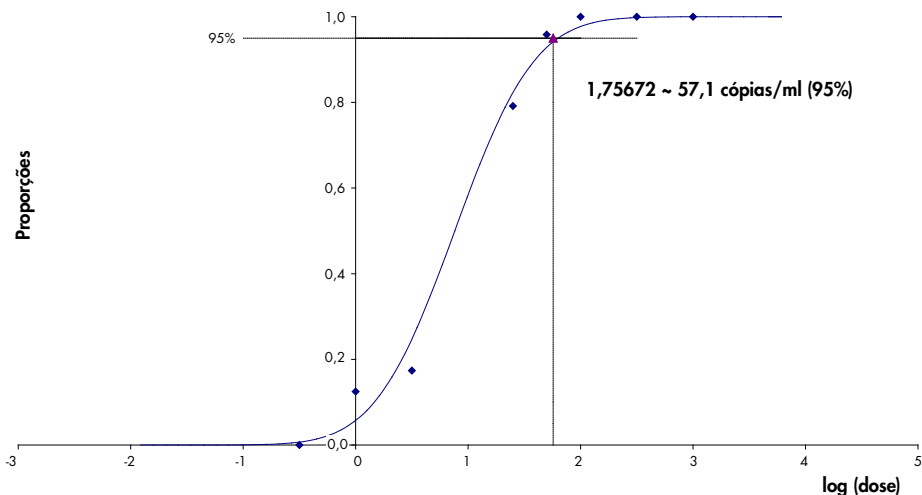


Figura 11. Análise de probit: CMV (Rotor-Gene 3000). Sensibilidade analítica relativa à purificação (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) do *artus* CMV RG PCR Kit no Rotor-Gene 3000.

Sensibilidade analítica relativa à purificação com o EZ1 DSP Virus Kit (volume de extração: 0,4 ml, volume de eluição: 60 µl) utilizando o instrumento EZ1 Advanced XL do *artus* CMV RG PCR Kit no Rotor-Gene 6000 é de 68,75 cópias/ml ($p = 0,05$). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite de 68,75 cópias/ml ser detetado.

Intervalo linear

O intervalo linear relativo à purificação com o EZ1 DSP Virus Kit (volume de extração: 0,4ml, volume de eluição: 60 µl) utilizando o instrumento EZ1 Advanced XL foi determinado mediante o teste de 4 a 6 réplicas de material do vírus CMV numa série de diluições de $3,16E+01$ a $1,00E+08$ cópias/ml.

Uma ilustração gráfica da análise de probit é apresentada na Figura 12 (na página seguinte).

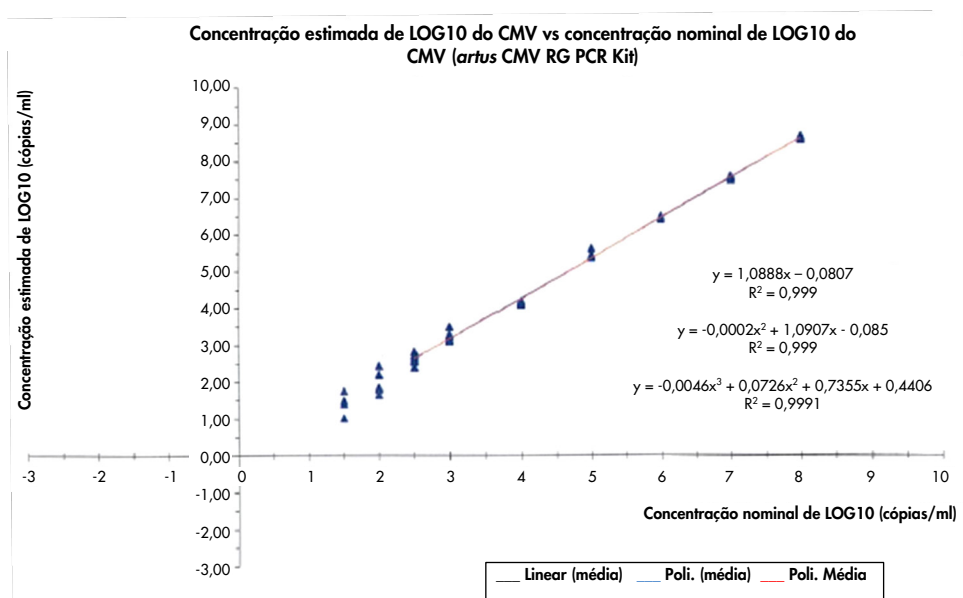


Figura 12. Regressão polinomial do conjunto de dados do *artus* CMV RG PCR Kit relativa à purificação (EZ1 DSP Virus Kit) no instrumento EZ1 Advanced XL. Estão incluídos modelos de regressão linear, quadrática e cúbica.

O intervalo linear do *artus* CMV RG PCR Kit relativo à purificação com o EZ1 DSP Virus Kit (volume de extração: 0,4ml, volume de eluição: 60µl) utilizando o instrumento EZ1 Advanced XL é de $3,16E+02$ até $1,00E+08$ cópias/ml.

Nota: O intervalo linear do *artus* CMV RG PCR Kit relativo à purificação com o QIAamp DSP Virus Kit (volume de extração: 0,4 ml, volume de eluição: 60 µl), é de $1,00E+01$ até $1,00E+04$ cópias/µl.

Especificidade

A especificidade do *artus* CMV RG PCR Kit é, em primeiro lugar, garantida através da seleção dos primers e das sondas, assim como da seleção de condições de reação rigorosas. Os primers e as sondas foram verificados em termos de possível homologia com todas as sequências publicadas nos bancos de genes, por análise comparativa de sequências. A detetabilidade de todas as estirpes relevantes foi assim assegurada.

Além disso, a especificidade foi validada com 100 amostras diferentes de plasma negativo para CMV. 99 destas amostras não geraram quaisquer sinais com os primers e as sondas específicos do CMV que estão incluídos no CMV RG Master.

Nota: Uma amostra que gerou um sinal nos primers e sondas específicos para CMV, que também testaram positivos para CMV nos *artus* CMV LC Kit e TM RG PCR Kit, é provavelmente positiva. A especificidade final baseada nos testes a 100 amostras de doadores individuais foi verificada como sendo de 99,00% (99/100).

Foi testada a possibilidade de reatividade cruzada do *artus* CMV RG PCR Kit utilizando o grupo de controlo listado na Tabela 5. Nenhum dos agentes patogénicos testados demonstrou reatividade. Não ocorreram reatividades cruzadas com infeções mistas.

Tabela 5. Testes de especificidade do kit com agentes patogénicos com potencial reatividade cruzada

Grupo de controlo	CMV (Cycling Green ou Cycling A.FAM)	Controlo interno (Cycling Yellow ou Cycling A.JOE)
Vírus herpes humano tipo 1 (vírus do herpes simplex 1)	–	+
Vírus herpes humano tipo 2 (vírus do herpes simplex 2)	–	+
Vírus herpes humano tipo 3 (vírus varicela-zóster)	–	+
Vírus herpes humano tipo 4 (vírus Epstein-Barr)	–	+
Vírus herpes humano tipo 6A	–	+
Vírus herpes humano tipo 6B	–	+
Vírus herpes humano tipo 7	–	+
Vírus herpes humano tipo 8 (vírus herpes associado ao sarcoma de Kaposi)	–	+
Vírus da hepatite A	–	+
Vírus da hepatite B	–	+
Vírus da hepatite C	–	+

(continuação na página seguinte)

Tabela 5 (continuação da página anterior)

Grupo de controlo	CMV (Cycling Green ou Cycling A.FAM)	Controlo interno (Cycling Yellow ou Cycling A.JOE)
Vírus da imunodeficiência humana 1	–	+
Vírus da leucemia de células T humano tipo 1	–	+
Vírus da leucemia de células T humano tipo 2	–	+
Vírus do Nilo Ocidental	–	+
Enterovírus	–	+
Parvovírus B19	–	+

Precisão

Os dados de precisão do *artus* CMV RG PCR Kit foram recolhidos através de instrumentos Rotor-Gene e permitem a determinação da variância total do ensaio. A variância total consiste na variabilidade no ensaio (variabilidade de múltiplos resultados de amostras da mesma concentração num ensaio), na variabilidade entre ensaios (variabilidade de múltiplos resultados do ensaio gerados nos diversos instrumentos do mesmo tipo, por diferentes operadores num laboratório) e na variabilidade entre lotes (variabilidade de múltiplos resultados do ensaio utilizando diversos lotes). Os dados obtidos foram utilizados para determinar o desvio padrão, a variância e o coeficiente de variação para o agente patogénico específico e a PCR de controlo interno.

Os dados de precisão do *artus* CMV RG PCR foram recolhidos utilizando o padrão de quantificação da concentração mais baixa (QS 4; 10 cópias/ μ l). O teste foi realizado com 8 réplicas. Os dados de precisão foram calculados com base nos valores de C_T das curvas de amplificação (C_T : ciclo de limiar, consulte a Tabela 6, na página seguinte). Além disso, foram determinados dados de precisão para resultados quantitativos em cópias/ μ l, utilizando os valores de C_T correspondentes (consulte a Tabela 7, na página seguinte). Tendo por base estes resultados, a dispersão estatística global de uma dada amostra com a concentração referida é de 1,21% (C_T) ou 14,38% (concentração), e 1,93% (C_T) para a deteção do controlo interno. Estes valores baseiam-se na totalidade de todos os valores individuais das variabilidades determinadas.

Tabela 6. Dados de precisão em função dos valores de C_T

	Desvio padrão	Variância	Coefficiente de variação (%)
Variabilidade no ensaio: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Variabilidade no ensaio: Controlo interno	0,31	0,10	1,16
Variabilidade entre ensaio: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Variabilidade entre ensaio: Controlo interno	0,47	0,22	1,77
Variabilidade entre lotes: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Variabilidade entre lotes: Controlo interno	0,53	0,28	2,02
Variância total: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Variância total: Controlo interno	0,51	0,26	1,93

Tabela 7. Dados de precisão com base nos resultados quantitativos (em cópias/μl)

	Desvio padrão	Variância	Coefficiente de variação (%)
Variabilidade no ensaio: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Variabilidade entre ensaio: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Variabilidade entre lotes: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Variância total: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

Substâncias interferentes

O ADN do CMV foi enriquecido no plasma negativo com diferentes anticoagulantes em diferentes sistemas de colheita de sangue disponíveis comercialmente. A concentração calculada (cópias/ml), média C_T , desvio padrão, variância e % de CV são apresentados na Tabela 8. O desvio padrão e o coeficiente de variação estão dentro do intervalo de 5% e, por conseguinte, do intervalo de tolerância. Não foi identificado qualquer impacto significativo na PCR devido às várias substâncias.

Tabela 8. Sistemas comerciais de colheita de sangue e dados de anticoagulantes

Substância	Concentração (cópias/ml)	Média C_T	Desvio padrão C_T	Variância C_T	CV (%) C_T
EDTA de potássio, Becton Dickinson®	399,60	31,06	0,11	0,01	0,36
EDTA de potássio, Sarstedt	350,10	31,26	0,30	0,09	0,97
EDTA de potássio, Greiner Bio-One®	285,00	31,58	0,50	0,25	1,58
EDTA de potássio, Springe (referência)	310,40	31,40	0,16	0,03	0,52
EDTA de potássio, Sarstedt (referência)	487,20	30,80	0,14	0,02	0,47
EDTA de potássio (gravidez)	423,30	33,2	0,26	0,07	0,79

As substâncias endógenas (Tabela 9, na página seguinte) foram enriquecidas em amostras de plasma EDTA positivas para CMV a 3 x LOD e 10 x LOD. Todas as amostras foram detetadas com sucesso, não se tendo observado qualquer interferência em amostras com níveis elevados de inibidores endógenos (bilirrubina, hemoglobina, triglicérido e albumina).

Tabela 9. Substâncias endógenas testadas

Substâncias interferentes	Concentração de substâncias interferentes
Bilirrubina	30 mg/dl
Hemoglobina	2 g/dl
Triglicérido	1 g/dl
Albumina	6 g/dl

Os fármacos comuns utilizados em contextos de transplante foram testados a 3x a concentração máxima aguda após um tratamento terapêutico com fármacos, conforme recomendado na diretriz EP07-A2 (11) do CLSI® (consulte a Tabela 10). Cada uma destas substâncias foi enriquecida em amostras negativas para CMV e positivas para CMV, tendo as mesmas sido testadas em 4 réplicas.

Todas as substâncias exógenas testadas não apresentaram qualquer influência significativa no desempenho do *artus* CMV RG PCR kit.

Tabela 10. Lista de fármacos testados como substâncias exógenas

Substâncias interferentes	Concentração de teste
Antibióticos	
Sulfametoxazol	200 mg/l
Trimetoprima	5,2 mg/l
Claforan® (Cefotaxima)	1 g/l
Tazobac® (Piperacilina + Tazobactam)	Piperacilina: 1 g/l Tazobactam: 125 mg/l
Ticarcilina	1 g/l
Augmentin® (Amoxicilina + Ácido clavulânico)	Amoxicilina: 125 mg/l Ácido clavulânico: 25 mg/l
Vancomicina	125 mg/l
Antifúngico	
Fluconazol	1 mg/l
Fármacos imunossupressores	
Rapamicina	100 mg/l
Micofenolato de sódio	80 mg/l

Robustez

A verificação da robustez permite a determinação da taxa de insucesso total do *artus* CMV RG PCR Kit. 100 amostras de plasma negativo para CMV foram enriquecidas com CMV a uma concentração final de 170 cópias/ml (uma concentração aproximadamente três vezes superior ao limite de sensibilidade analítica). Após a extração utilizando o QIAamp DSP Virus Kit, estas amostras foram analisadas com o *artus* CMV RG PCR Kit. A taxa de erro para CMV foi de 0% para a totalidade das amostras. Adicionalmente, a robustez do controlo interno foi avaliada por purificação e análise das 100 amostras de plasma negativo para CMV. A robustez do *artus* CMV RG PCR Kit é de $\geq 99\%$.

Reprodutibilidade

Os dados de reprodutibilidade permitem uma avaliação regular do desempenho do *artus* CMV RG PCR Kit, bem como uma comparação de eficiência com outros produtos. Estes dados foram obtidos pela participação em programas de proficiência estabelecidos.

Adicionalmente à participação em programas de proficiência estabelecidos, um painel de 10 membros do CMV (Tabela 11) foi testado em 3 laboratórios externos utilizando o EZ1 DSP Virus Kit no instrumento EZ1 Advanced XL para purificar ácidos nucleicos e o *artus* RG PCR kit para testar ADN eluído.

Tabela 11. Resumo dos membros do painel do CMV

Número do painel (Tipo de membro do painel)	Membro do painel	Efeito de diluição
1001 (1)	Negativo	Pool de negativos 1
1002 (1)	Negativo	Pool de negativos 2
1003 (2)	Altamente negativo	50% positivo
1004 (2)	Altamente negativo	50% positivo
1005 (3)	Fracamente positivo	200 cópias/ml
1006 (3)	Fracamente positivo	200 cópias/ml
1007 (4)	Positivo moderado	2000 cópias/ml
1008 (4)	Positivo moderado	2000 cópias/ml
1009 (5)	Altamente positivo	200 000 cópias/ml
1010 (5)	Altamente positivo	200 000 cópias/ml

O painel de 10 membros foi testado em duplicado todos os dias por 2 operadores diferentes, durante 6 dias em cada local com 3 lotes de kits de reagentes. Assim, 20 amostras multiplicadas por 2 operadores durante 6 dias em 3 locais equivale a 720 pontos de dados.

Concluiu-se que a reprodutibilidade total do teste *artus* CMV RGQ MDx é de $\leq 12\%$ CV para amostras com uma concentração entre 200 cópias/ml e 200 000 cópias/ml (Tabela 12)

Tabela 12. Resumo geral (cada tipo de membro do painel) – médias observadas

Tipo de membro do painel	N.º de obs.	Média	Mediana	Desvio padrão	Percentagem de CV	Mínimo
1	144	0,02	0,00	0,158	849,84	0,00
2	144	0,68	0,83	0,630	92,19	-0,10
3	144	1,91	1,95	0,226	11,83	0,98
4	144	2,96	2,96	0,168	5,68	2,16
5	144	5,03	5,03	0,091	1,80	4,75

O resumo geral da variância percentual e do desvio padrão para os valores de \log_{10} UI/ml para cada um dos 5 painéis em todo o lote, local, operador, dia, entre execuções e na execução é apresentado na Tabela 13 (na página seguinte).

Tabela 13. Resumo geral da variância e do desvio padrão

Amostra	1	2	3	4	5	
Tipo de amostra	negativa	altamente negativa	fracamente positiva	positiva moderada	altamente positiva	
Média observada de log₁₀ UI/ml	0,02	0,68	1,91	2,96	5,03	
N.º de testes	144	144	144	144	144	
Medição	% de variância DP					
Lote	0	3,10	0	0	3,00	
	0	0,113	0	0	0,016	
Local	0	0	0	0,90	0	
	0	0	0	0,016	0	
Operador	4,3	4,6	0	18,8	15,4	
	0,033	0,136	0	0,074	0,037	
Componente de variância	Dia	0	0	8,60	6,00	48,10
		0	0	0,067	0,042	0,065
	Entre execuções	0	0	4,40	10,90	7,90
		0	0	0,048	0,057	0,026
	Na execução	95,7	92,3	87	63,40	25,60
		0,155	0,611	0,212	0,136	0,048
	Total	100	100	100	100	100
		0,158	0,635	0,227	0,171	0,094

Avaliação de diagnóstico

O *artus* CMV RG PCR Kit foi avaliado num estudo comparativo entre o *artus* CMV RG PCR Kit e o COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test. Foram analisadas 156 amostras clínicas retrospectivas e prospetivas de plasma EDTA. Todas as amostras de espécimes tinham sido analisadas anteriormente como positivas ou negativas utilizando o COBAS AMPLICOR CMV MONITOR para diagnósticos de rotina.

O ADN do CMV para testar o *artus* CMV RG PCR Kit foi isolado utilizando o QIAamp DSP Virus Kit, com o controlo interno do *artus* CMV RG PCR Kit adicionado ao isolamento, tendo a análise sido realizada no Rotor-Gene 3000. Os espécimes para o COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test foram processados e analisados de acordo com as instruções do fabricante fornecidas na bula.

Todas as 11 amostras que apresentaram um resultado positivo com o COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test também apresentaram um resultado positivo com o *artus* CMV RG PCR Kit. 123 de 145 amostras que apresentaram um resultado negativo com o COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test também apresentaram um resultado negativo com o *artus* CMV RG PCR Kit. Foram obtidos 22 resultados discordantes (Tabela 14).

Tabela 14. Resultados do estudo de validação comparativo

		COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test		Total
		+	-	
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit	+	11	22	33
	-	0	123	123

Se os resultados do COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test servirem de referência, a sensibilidade de diagnóstico de todas as amostras do *artus* CMV RG PCR Kit é de 100% e a especificidade de diagnóstico é de 84,8%.

A realização de mais testes às 22 amostras discordantes confirmou os resultados dos *artus* PCR Kits. Por conseguinte, é possível pressupor que a discrepância tem por base a sensibilidade mais elevada do *artus* CMV RG PCR Kit.

Referências

1. Plosa E.J., Esbenshade J.C., Fuller M.P., and Weitkamp J.H. (2012). Cytomegalovirus Infection. *Pediatr. Rev.* **33**, 156-163.
2. Furui Y., Satake M., Hoshi Y., Uchida S., Suzuki K., and Tadokoro K. (2013). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalance in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors. *Transfusion.* **53**, 2190-2197.
3. Atabani, S.F., et al. (2012). Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *Am. J. Transplant.* **12**, 2457-2464.
4. Enders G., Daiminger A., Bäder U., Exler S., and Enders M. (2011). Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J. Clin. Virol.* **52**, 244-246.
5. Kotton, C.N., et al. (2018). The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation.* **102**, 900-931.
6. Lancini D, Faddy H.M., Flower R., and Hogan C. (2014). Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *Med. J. Aust.* **201**, 578-580.
7. Eddleston M, Peacock S, Juniper M, and Warrell DA. (1997). Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* **24**, 52-56.
8. Mackay, I.M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 190-212.
9. Nesbitt S.E., Cook L., Jerome K.R. (2004). Cytomegalovirus quantitation by real-time PCR is unaffected by delayed separation of plasma from whole blood. **42**, 1296-1297.
10. Abdul-Ali D., Kraft C.S., Ingersoll J., Frempong M., Caliendo A.M. (2011). Cytomegalovirus DNA stability in EDTA Anti-Coagulated Whole Blood and Plasma Samples. *J. Clin. Virol.* **52**, 222-224
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2005). *Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline – Second Edition*. CLSI Document EP07-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver quaisquer problemas que possam surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de apoio técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Comentários e sugestões

Ausência de sinal com controlos positivos (CMV QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green

- | | |
|---|--|
| a) O canal de fluorescência selecionado para a análise de dados de PCR não está em conformidade com o protocolo | Para análise de dados, selecionar o canal de fluorescência Cycling Green para a PCR analítica do CMV e o canal de fluorescência Cycling Yellow para a PCR do controlo interno. |
| b) Programação incorreta do perfil de temperatura do instrumento Rotor-Gene | Compare o perfil de temperatura com o protocolo. Consultar "Protocolo: PCR e análise de dados", na página 14. |
| c) Configuração incorreta da PCR | Verifique os seus passos de trabalho em relação ao esquema de pipetagem e repita a PCR, se necessário. Consultar "Protocolo: PCR e análise de dados", na página 14. |
| d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em "Armazenamento e manuseamento de reagentes", na página 10 | Verifique as condições de armazenamento e o prazo de validade dos reagentes (consulte o rótulo do kit) e, se necessário, utilize um novo kit. |
| e) O prazo de validade do <i>artus</i> CMV RG PCR Kit expirou | Verifique as condições de armazenamento e o prazo de validade dos reagentes (consulte o rótulo do kit) e, se necessário, utilize um novo kit. |

Sinal fraco ou ausente do controlo interno de uma amostra de plasma negativo, sujeita a purificação utilizando o QIAamp DSP Virus Kit ($C_t = 27 \pm 3$; limiar, 0,03) no canal de fluorescência Cycling Yellow e ausência simultânea de sinal no canal Cycling Green

- | | |
|--|--|
| a) As condições da PCR não cumprem o protocolo | Verifique as condições da PCR (ver acima) e repita a PCR com as definições corrigidas, se necessário. |
| b) A PCR foi inibida | Certifique-se de que utiliza o método de isolamento recomendado e que segue rigorosamente as instruções do fabricante. |

Comentários e sugestões

- | | |
|---|--|
| c) O ADN foi perdido durante a extração | Se o controlo interno tiver sido adicionado à extração, a ausência de um sinal do controlo interno pode indicar a perda de ADN durante a extração. Certifique-se de que utiliza o método de isolamento recomendado (consultar "Isolamento de ADN", na página 12) e de que segue rigorosamente as instruções do fabricante. |
| d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em "Armazenamento e manuseamento de reagentes", na página 10 | Verifique as condições de armazenamento e o prazo de validade dos reagentes (consulte o rótulo do kit) e, se necessário, utilize um novo kit. |
| e) O prazo de validade do <i>artus</i> CMV RG PCR Kit expirou | Verifique as condições de armazenamento e o prazo de validade dos reagentes (consulte o rótulo do kit) e, se necessário, utilize um novo kit. |

Sinais com controlos negativos no canal de fluorescência Cycling Green da PCR analítica

- | | |
|---|--|
| a) Ocorrência de contaminação durante a preparação da PCR | Repita a PCR com novos reagentes nas réplicas.
Se possível, feche os tubos de PCR diretamente após adicionar a amostra a ser testada.
Certifique-se de que pipeta os controlos positivos em último lugar.
Certifique-se de que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente. |
| b) Contaminação ocorrida durante a extração | Repita a extração e a PCR da amostra a ser testada utilizando novos reagentes.
Certifique-se de que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente. |

Símbolos



<N>

Contém reagentes suficientes para <N> testes



Prazo de validade



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Número de catálogo



Número de lote



Número do material



Componentes



Contém



Número



Número global de item comercial



Limites de temperatura



Fabricante



Consultar as instruções de utilização

Informações de encomenda

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
artus CMV RG PCR Kit (24)	Para 24 reações: Principal, solução de magnésio, 4 padrões de quantificação, controlo interno, água (grau PCR)	4503263
artus CMV RG PCR Kit (96)	Para 96 reações: Principal, solução de magnésio, 4 padrões de quantificação, controlo interno, água (grau PCR)	4503265
EZ1 DSP Virus Kit – para a purificação simultânea e automática de ADN e ARN virais a partir de 1–14 amostras de soro, plasma ou LCR		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Para 48 preparações de ácidos nucleicos virais: Cartuchos de reagente previamente enchidos, suportes de pipetas descartáveis, pontas com filtro descartáveis, tubos de amostra, tubos de eluição, tampões, ARN transportador	62724
QIAamp DSP Virus Kit – para purificação de ácidos nucleicos virais do plasma humano para fins de diagnóstico in vitro		
QIAamp DSP Virus Kit	Para 50 preparações: QIAamp MinElute® Spin Columns, tampões, reagentes, tubos, extensores da coluna e VacConnectors	60704
Rotor-Gene Q MDx e acessórios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Ciclador real-time PCR com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim), computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em peças e mão de obra; instalação e formação não incluídas	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Ciclador real-time PCR com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim), computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em peças e mão de obra, instalação e formação	9002023

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador real-time PCR e analisador de fusão de alta resolução com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em peças e mão de obra; instalação e formação não incluídas	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclador real-time PCR e analisador de fusão de alta resolução com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em peças e mão de obra, instalação e formação	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Instrumento real-time PCR com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim), incluindo computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em peças e mão de obra; instalação e formação não incluídas	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Instrumento real-time PCR com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim), incluindo computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em peças e mão de obra, instalação e formação	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Ciclador real-time PCR com 2 canais (verde, amarelo), computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em peças e mão de obra; instalação e formação não incluídas	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Ciclador real-time PCR com 2 canais (verde, amarelo), computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em peças e mão de obra, instalação e formação	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Ciclador real-time PCR e analisador de fusão de alta resolução com 2 canais (verde, amarelo) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em peças e mão de obra; instalação e formação não incluídas	9002012

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Ciclador real-time PCR e analisador de fusão de alta resolução com 2 canais (verde, amarelo) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em peças e mão de obra, instalação e formação	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloco de alumínio para a preparação manual da reação com uma pipeta de canal único em 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloco de alumínio para a configuração manual da reação num conjunto 8 x 12 padrão utilizando 96 tubos de 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reações	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10 000 reações	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tubos de paredes finas para 1000 reações	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tubos de paredes finas para 10 000 reações	981008

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o respetivo manual do utilizador ou o manual do kit QIAGEN. Os manuais do utilizador e os manuais do kit QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados aos Serviços de Assistência da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Histórico de revisões do documento

Revisão	Alterações
R6, março de 2021	Adição das secções Intervalo linear, Substâncias interferentes e Reprodutibilidade. Atualizações às secções Utilização prevista e Quantificação. Remoção das referências aos instrumentos QIAGEN que já não são suportados.
R7, dezembro de 2021	Correção da secção Conteúdo do kit através da adição de detalhes sobre o formato do kit de 24 testes

Acordo de licença limitada para o *artus* CMV RG PCR Kit

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infringem os direitos de terceiros.
3. Este kit e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, recondicionados ou objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do kit concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Acordo de licença limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Acordo de licença limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com.

A aquisição deste produto permite ao comprador utilizá-lo para o desempenho de serviços de diagnóstico em diagnósticos *in vitro* humanos. Não se garante nenhuma patente geral ou qualquer outro tipo de licença para além deste direito específico de utilização concedido no momento da aquisição.

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, EZ1®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); CLSI®, (Clinical Laboratory and Standards, Inc.); Augmentin® (Glaxo Group Limited); Tazobac® (Pfizer Inc.); AMPPLICOR®, COBAS®, MONITOR® (Roche Group); Claforan (Sanofi-Aventis Group); FAM™, JOE™ (Thermo Fisher Scientific).

HB-0046-009 1126759 R7 12/2021© 2021 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Encomendas www.qiagen.com/shop | Apoio técnico support.qiagen.com | Site www.qiagen.com